Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Direktor: Prof. Dr. H. Roemer

Untersuchungen über Proteolytische Enzyme und Phosphatasen im Corpus Rubrum und Corpus Luteum vom Schwein

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
ANWAR KIDESS
aus
Ramallah/Palästina

7049

1962

Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Direktor: Prof. Dr. H. Roemer

Untersuchungen über Proteolytische Enzyme und Phosphatasen im Corpus Rubrum und Corpus Luteum vom Schwein

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
ANWAR KIDESS
aus
Ramallah/Palästina

1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr. E. Tonutti

Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

Fotodruck P R Ä Z I S · Tübingen

An dieser Stelle möchte ich
Herrn Professor Dr. H. R o e m e r
für die Überlassung des Themas und
Herrn Dr. G. Jung für seine freundliche
Hilfe bei der Durchführung der Arbeit
herzlich danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0052

Inhaltsverzeichnis

Einleitung Seite 1

A. Fermente:

1) Allgemeine Charakterisierung der Fermente " 2

2) Chemische Eigenschaften " 3

3) Abhängigkeit von Temperatur und pH " 5

4) Proteasen " 6

5) Phosphatasen " 8

Hormone und Beziehungen zu den Fermenten " 9

Fermente im Ovar " 11

1) Gesamtovar " 11

2) Liquor folliculi " 13

3) Corpus luteum " 14

B. Eigene Untersuchungen

1) Gewinnung von Zellfraktionen aus Corpus luteum " 15

2) Nachweis proteolytischer Fermente " 18

3) Nachweis von saurer Phosphatase " 21

4) Nachweis von alkalischer Phosphatase " 21

5) Stickstoffbestimmung " 24

C. Ergebnisse " 26

D. Diskussion " 4o

E. Zusammenfassung " 43

F. Literaturverzeichnis " 44

Einleitung

In der Follikelflüssigkeit von Schweineovarien konnten von JUNG und HELD proteolytische Enzyme, Phosphatasen und Esterasen nachgewiesen werden. Wie Untersuchungen von JUNG und E.KIDES ergeben haben, werden diese Fermente anscheinend im Ovargewebe gebildet. und von hier aus an den Liquor follikuli abgegeben. Die Aktivität im Gesamtovar ist nämlich erheblich höher als in der Follikelflüssigkeit und beträgt z.B. für die proteolytischen Enzyme im Homogenat 1134 Tyrosin/mg N/Std..

Da Ovargewebe aus verschiedenen Teilen zusammengesetzt ist, sollte von uns festgestellt werden, ob im Corpus luteum eine dem Gesamtovargewebe entsprechende Fermentaktivität enthalten ist. Von Histochemikern wird bei Untersuchungen nämlich vor allem im Corpus luteum eine Enzymtätigkeit nachgewiesen.
Unsere Aufgabe ist es, deshalb im Corpus luteum von Schweineovarien die proteolytische Aktivität zu messen und zu prüfen, ob alkalische oder saure Phosphatasen nachzuweisen sind.

Bevor wir auf die eigenen Arbeiten eingehen, ist es zunächst notwendig, aus der Literatur einige wichtige Punkte über die Enzyme und über das Ovar selbst zusammenzustellen.

D I E F E R M E N T E [1)]

Allgemeine Charakterisierung der Fermente:

Fermentative Vorgänge waren den Menschen offenbar schon in vorgeschichtlicher Zeit bekannt, so die Fäulnis oder die Gärung des Zuckers. " Ferment " ist ursprünglich der Name des Agens, das die alkoholische Gärung auslöst. Dassdie Hefe ein lebender Organismus ist, wurde aber erst 1835 von CAGNIARD DE LATOUR und unabhängig 1837 von THEODOR SCHWANN (dem Schöpfer der Zellenlehre) erkannt. Für die löslichen, nicht organisierten Fermente, wie sie sich z.B. in den Verdauungssäften finden, hat KÜHNE später 1878 den Namen " ENZYM " eingeführt. Nachdem sich aber herausgestellt hatte, dass auch die alkoholische Gärung auf der Wirkung von Stoffen beruht, die von der Zelle abgetrennt werden können (BUCHNER 1897), wurde diese Unterscheidung überflüssig. " FERMENT " und " ENZYM " werden heute als synonyme Ausdrücke gebraucht.

Die Natur der Fermentwirkungen wurde schon vor mehr als einem Jahrhundert vom Schwedischen Chemiker J.J.BERZELIUS mit bewunderungswürdigem Scharfblick erkannt (1836). Es fiel ihm auf, dass viele chemische Vorgänge in der organischen Natur andersartig verlaufen als die Umsetzungen der Stoffe im Reagensglas. Das Besondere liegt darin, dass diese Reaktionen durch Körper ausgelöst werden, die an den Umsetzungen gar nicht teilzunehmen scheinen, wie etwa die Gärung de Zucker durch die Hefe. Er schrieb diese Wirkung einer besonderen, diesem Körper innewohnenden Kraft zu und verglich sie mit der zersetzenden Wirkung des Platins und anderer Stoffe auf das Wasserstoffsuperoxyd, eine Erscheinung, die gleichfalls nicht durch eine stöchiometrisch verlaufende Reaktion erklärt werden konnte.

Die Fermente sind Katalysatoren und sie beherrschen das biologische Geschehen in weitestem Umfang. Nach WILHELM OSTWALD ist die Katalyse "die Beschleunigung eines

langsam verlaufenden chemischen Vorgangs durch die Gegenwart eines fremden Stoffes ".

Die Fermentwirkungen beruhen immer darauf, dass das Ferment sich mit dem reagierenden Stoff verbindet. Im Verlauf der Reaktion wird aber das Ferment wieder freigesetzt; daher tritt es in der Bilanz des Vorgangs gar nicht auf.

Der Stoff, der in Gegenwart des Fermentes umgesetzt wird, heisst ganz allgemein das Substrat des betreffenden Ferments. Durch die Bindung an das Ferment werden im Molekül des Substrats die Bindungskräfte zwischen bestimmten Atomen derart verändert, dass eine chemische Reaktion eintreten kann. Je nach Art des Ferments, mit welchem das Substrat sich verbindet, können bei ein und demselben Molekül ganz verschiedene Reaktionen ausgelöst werden.

Chemische Natur der Fermente:

Es ist in neuerer Zeit gelungen, eine grosse Zahl von Fermenten in reinem Zustand darzustellen. Erst damit ist die Möglichkeit zur genaueren Erforschung ihrer Eigenschaften gegeben. Das erste Beispiel eines reinen, kristallisierten Ferments war die Urease (SUMMER 1926). Es folgte die Reindarstellung verschiedener Verdauungsfermente, und schliesslich wurde auch eine ganze Reihe der Enzyme, welche an Oxydationsvorgängen oder an der Gärung teilnehmen, in kristallisiertem Zustand erhalten. Alle diese Stoffe sind Proteine.

Man weiss schon lange, dass die Fermente Kolloide sind. Sie diffundieren nicht durch Pergament oder Kolloidmembrane und zeigen überhaupt viele Eigenschaften, die für den kolloidalen Zustand charakteristisch sind. Hauptsächlich von R.WILLSTÄTTER wurde die Vorstellung entwickelt, dass jedes Ferment aus einem kolloidalen " Träger " und einer " Wirkungsgruppe " besteht.

In der Eiweißchemie bezeichnet man eine mit dem Eiweißmolekül verbundene Gruppe nicht eiweißartiger Natur als "prosthetische Gruppe" (KOSSEL) 1893. Die Verbindung der beiden ist ein "Proteid". Nach EULER unterscheidet man verschiedene Fermentkomponenten:

Apoferment (Fermentprotein)
Co-ferment (Wirkungsgruppe, prosthetische Gruppe)
u. Holoferment (aktives Ferment, Verbindung von Apo- und Co-ferment).

Das Protein bestimmt weitgehend die Wirkungsweise des Coferments. So kann z.B. das Coferment der Dehydrierung, die Cozymase, mit ganz verschiedenen Substraten reagieren, je nach dem Apoferment, mit dem es verbunden ist.

Es ist nicht bei allen Fermenten möglich, eine besondere Wirkungsgruppe abzutrennen. So erweisen sich z.B. viele hydrolysierende Fermente wie Pepsin, Trypsin u.a.m. als einheitliche Proteine. Man muss auch hier annehmen, dass begrenzte, spezifische Atomgruppierungen in Eiweißmolekül die katalytische Wirkung hervorbringen.

Allgemeine Eigenschaften der Fermente:

Das physikalische und chemische Verhalten der Fermente erklärt sich aus ihrer Eiweißnatur. Sie diffundieren nicht durch Membranen und können daher von niedrigmolekularen Stoffen durch Dialyse getrennt werden. Sie werden durch hohe Konzentrationen von Neutralsalzen ausgefällt (Aussalzung), eine Eigenschaft, von der man bei der Reinigung häufig Gebrauch macht. Enzyme werden durch alle Agenzien inaktiviert, welche Proteine denaturieren; daher rührt ihre geringe Stabilität. Erhitzen auf Temperaturen über 60°C, längerer Kontakt mit organischen Lösungsmitteln, Zusatz von Schwermetallen u.s.w. können die Denaturierung des Fermentproteins bewirken und damit das Ferment unwirksam machen.

Abhängigkeit der Fermentwirkung von der Temperatur und vom Milieu:

Wie bei jeder chemischen Reaktion nimmt auch bei Fermentreaktionen die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur zu. Beim Gefrierpunkt des Wassers ist sie in der Regel sehr gering. Bei Temperaturen über 40° - 50°C setzt aber die Denaturierung des Fermentproteins ein, so dass die Aktivität rasch absinkt und völlig vernichtet wird. Es gibt daher für die Fermentwirkungen eine optimale Temperatur, die von Ferment zu Ferment etwas verschieden sein kann, meist zwischen 40° - 50°C erreicht wird.

Von Bedeutung für die Fermentwirkungen ist die Wasserstoffionenkonzentration. Erst durch die Einführung des pH-Begriffs ist eine exakte Fermentchemie möglich geworden. Es ist vor allem das Verdienst von S.P.L. SÖRENSEN (2), die Methoden für die Bestimmung des pH (die Bezeichnung stammt von ihm) geschaffen und seine Bedeutung für die Fermentchemie aufgedeckt zu haben (1). Die Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst die Wirkung der Fermente in entscheidender Weise. So wirkt z.B. das Pepsin des Magens bei saurer Reaktion, während das Trypsin nur bei annähernd neutraler Reaktion Eiweiß spaltet. Untersucht man die Wirkung irgend eines Ferments in Lösungen von verschiedenen pH-Werten, so ergibt sich für einen bestimmten pH-Wert oder Bereich eine maximale Wirksamkeit. Dies ist das pH-Optimum. Man findet z.B. für Pepsin die optimale Wirkung bei pH 1,5 - 1,6, für Trypsin bei 7,8 - 8,7, für Urease bei 7,o, für Arginase bei 9,o - 9,5, fur Saccharase bei 4 - 5, für Katalase bei 6,5 - 7 u.s.w.

Trägt man die Aktivität eines Fermentes gegen die pH-Werte in ein Koordinationssystem ein, erhält man die pH-Aktivitätskurve des betreffenden Ferments.

Es hat sich gezeigt, dass in unreinen Fermentlösungen, wie sie in den natürlichen Sekreten oder Organextrakten immer vorliegen, die Begleitkörper, mit denen das Ferment mehr

oder weniger assoziiert ist, einen Einfluss auf das pH-Optimum besitzen. So kommt im Magen fettspaltendes Ferment, eine Lipase, vor, welche bei pH 4 - 5 optimal wirkt; andererseits findet sich im Pankreas eine Lipase vom Optimum pH 8. Wird die Magenlipase aber von den Begleitkörpern getrennt, so ändert sich auch das Optimum, und man erhält schliesslich eine Fermentlösung, welche in ihrer Wirkung identisch mit der Pankreaslipase ist:

Die Abhängigkeit der Fermentwirkung vom pH-Wert des Milieus steht mit der Dissoziation der sauren oder basischen Gruppen im Fermentprotein in Zusammenhang.

Wir kennen eine Reihe von Fermenten, deren Aktivität in spezifischer Weise von bestimmten Ionen abhängig ist. Es sind insbesondere die zweiwertigen Metalle Mg^{++}, Ca^{++}, Mn^{++} und andere, welche als Aktivatoren eine Rolle spielen. Sie bilden wahrscheinlich mit den Fermentproteinen definierte Komplexe (Metallproteide). In einzelnen Fällen wirken auch Anionen aktivierend, so z.B. die Halogenionen bei der Amylase. Ausserdem lassen sich vielfach unspezifische oder jedenfalls nicht genauer definierbare Einflüsse des Salzmilieus auf die Fermentwirkung feststellen. Auch alle möglichen organischen Stoffe vermögen die Aktivität von Fermenten zu verändern, teils im Sinne einer Förderung, teils im Sinne einer Hemmung.

Eigenschaften der Proteasen:

"Die Proteasen sind die wichtigsten biologischen Katalysatoren des Eiweißstoffwechsels. Ihre Wirkung besteht in der Aufspaltung und Knüpfung von Peptidbindungen, Substrate sind die Eiweißstoffe und deren Abbaustufen, die Peptide". Je nach der Stelle im Eiweißmolekül, an der die Hydrolyse durch die Proteasen stattfindet, unterteilt man diese in Proteinasen und Peptidasen. Proteinasen spalten vollständige Eiweißkörper, Peptidasen greifen die schon bis zu den

Peptiden abgebauten Eiweisse an.

Unter die Proteinasen fallen:

1.) Das Pepsin, das bei stark saurer Reaktion wirkt, Proteinkationen angreift und die Eiweisskörper zu Albumosen und Peptonen abbaut,
2.) das Trypsin, das bei neutraler oder alkalischer Reaktion Proteinanionen angreift,
3.) das Kathepsin, das bei schwach saurer Reaktion sein Wirkungsoptimum hat und isoelektrische Eiweisskörper spaltet.

WILLSTÄTTER und BAMANN (3) benannten erstmalig das von HEDIN und ROWLAND (4) nachgewiesene proteolytische Ferment, das intrazellulär in allen tierischen Geweben vorkommt und nach dem Tode die bakterienfreie Autolyse der Gewebe bewirkt, als Kathepsin. Es findet sich ausser in den Zellen auch im Magensaft, wie FREUDENBERG (5) gezeigt hat, und ist der Pflanzenproteinase, dem Papain, im Hinblick auf pH-Optimum, Aktivierung und Hemmung sehr ähnlich. Es ist in schwach saurem Milieu am wirksamsten. Welche Aufgabe es in der lebenden Zelle, die ein pH von etwa 7 zeigt, zu erfüllen hat, ist noch ungewiss. Nach LANG (6) kommt ihm im sauren Milieu die Proteolyse zu, während bei der physiologischen Reaktion Transpeptidierungen erfolgen.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Kathepsin eine Bedeutung für die Eiweißsynthese hat. TAUBER (7) findet in den für die Eiweißsynthese verantwortlichen Zellen eine hohe Kathepsinaktivität. GOLDSTEIN und GINTSBOURG (8) finden einen erhöhten Kathepsingehalt in wachsenden Organen, vor allem in Embryonen. BERGMANN und FRAENKEL-CONRAT (9) kommen zu demselben Ergebnis. STARK und SIEBERT (1o) sehen in der erniedrigten Kathepsinaktivität der Placenta am Ende der Schwangerschaft das Zeichen eines verminderten Eiweißumsatzes und MERTEN (11) konnte zeigen, dass der Kathepsinspiegel im Harn bei Hungerzuständen fällt.

Das Kathepsin wird aktiviert durch HCN, H_2S, Cystein, Gluthation und Ascorbinsäure-Fe-Kombinationen. Oxydationsmittel und Jodessigsäure hemmen seine Wirkung.

Bis zum Jahre 1937 galt das Kathepsin als eine einheitliche Proteinase, die natives sowie denaturiertes Eiweiss spaltet. BERGMANN und FRUTON (12) sehen das Kathepsin als einen Enzymkomplex und unterschieden vier verschiedene Kathepsine, die sie mit Kathepsin I, II, III und IV bezeichnen.

Diese Klassifikation wurde kürzlich durch eine neue Einteilung ersetzt, in der die Bezeichnung Kathepsin auf Fermente vom Endopeptidasetypus beschränkt wird.

SCHÄFFNER und TRULLE (13) unterscheiden dagegen zwei Enzymanteile am Kathepsin und zwar ein "gelatinespaltendes Enzym" (G.E.) von einem "hämoglobinspaltenden Enzym" (H.E.). Sie konnten diese beiden Enzyme trennen. Das H.E. hydrolysiert neben Hämoglobin Casein und Serumeiweiß und zeigt im Gegensatz zum G.E. keine Aktivierungs- und Hemmungserscheinungen. Sie fanden eine optimale Wirkung des G.E. und H.E. bei pH 3,5 und glauben, dass das H.E. der von ANSON (14) mittels seiner kolorimetrischen Methode erfassten intracellulären Proteinase gleichzusetzen ist. LANG und WEGENER (15) finden neben dem G.E. und H.E. noch eine weitere, mit dem Kathepsin vergesellschaftete Gewebsproteinase, die ebenfalls zur Hämoglobinspaltung befähigt ist und durch Cystein und Ascorbinsäure aktiviert, durch Cu^{++} gehemmt wird. Da dieses Enzym durch die Tyrosinbestimmung nach ANSON (14) erfasst wird, schlagen die Verfasser die Bezeichnung "Kathepsin T" vor. Manche noch unsicheren Befunde über das Kathepsin als Enzymkomplex bedürfen weiterer Untersuchungen.

Eigenschaften der Phosphatasen:

Die Phosphatasen gehören zu der grossen Gruppe der Esterasen. Ihre Substrate sind Ester der Phosphorsäure. Sie nehmen eine überragende Stellung ein in den Stoffwechselvorgängen

des Organismus und kommen fast in jedem Gewebe vor.

Sie werden nach ihrer Substratspezifität, ihrem pH-Optimum und ihrer Aktivierung und Hemmung durch Zusätze in Phosphomonoesterasen, Phosphodiesterasen, Pyrophosphatasen, die Adenylphosphatase und die Phosphorylasen eingeteilt. Von den verschiedenen Phosphatasen wurden in dieser Arbeit nur die Phosphomonoesterasen bestimmt. Sie hydrolysieren praktisch alle Ester der Orthophosphorsäure, die nur mit einer Alkoholgruppe verestert sind. Je nach ihrem pH-Optimum und ihrem Verhalten gegen Hemmungs- und Aktivierungskörper werden drei unterschieden:

1.) Die alkalische Phosphatase hat ihr pH-Optimum bei pH 9 - 10. Sie wird stark durch Mg- und Mn-Salze aktiviert und durch Alloxan gehemmt. Ein grosser Teil des Enzyms ist ein Desmoenzym, d.h. ein Ferment, das fest in der Zellstruktur verankert ist. ß-Glycerophosphat wird von ihm rascher gespalten als α-Glycerophosphat.

2.) Eine zweite, neutrale Monophosphoesterase mit einem Wirkungsoptimum bei pH 6 - 7 findet sich in der Hefe und in Erythrocyten. Sie wird von Mg- und Mn-Salzen aktiviert und spaltet α-Glycerophosphat rascher als ß-Glycerophosphat.

3.) Das pH-Optimum der sauren Phosphatase liegt bei pH 6-5. Sie wird im Gegensatz zur neutralen Phosphatase von Mg-Salzen nicht aktiviert und spaltet ß-Glycerophosphat rascher als α-Glycerophosphat.

Die meisten Phosphatasen werden durch Phosphate gehemmt. Die meisten Phosphatasen werden auch durch Fluorid, Cystein und Ascorbinsäure gehemmt.

Die Hormone und ihre Beziehungen zu den Fermenten:

Da unsere Untersuchungen über ein Organ innerer Sekretion handeln, ist es angebracht, an dieser Stelle auf die Beziehungen zwischen Hormonen und Fermenten einzugehen.

BAYLISS und STARLING bezeichnen Stoffe, die durch spezifische Leistungen besonderer Zellen und Organe gebildet werden und die in schon ganz geringer Konzentration eine hohe biologische Wirksamkeit besitzen, als Hormone. Sie werden von den Zellen unmittelbar an das Blut abgegeben, CLAUDE BERNARD prägte hierfür den Begriff der inneren Sekretion.

Alle Hormone, die man bis jetzt isolieren konnte, sind entweder Proteine, Steroide oder Polypeptide (16).
Über die Art und Weise, wie die Hormone wirksam sind, können noch keine Aussagen gemacht werden. Man weiss, dass sie Fermente beeinflussen und dadurch auf den Stoffwechsel im Sinne einer Ana- oder Katabiose wirken. Für eine Aktivierung bzw. Inaktivierung von Fermenten durch Hormone bringt die Literatur zahllose Beispiele.

Um eines von ihnen anzuführen, seien die Versuche von PURR (17) genannt. PURR findet, dass Kathepsin und Papain nicht nur durch Cystein, sondern auch durch Östradiolbenzoat aktiviert werden. Er schliesst daraus einen sicheren Zusammenhang zwischen weiblichem Keimdrüsenhormon und intracellulärer Proteolyse.

DIRSCHERL (18) sieht zwei Möglichkeiten der Hormonwirkung. Einmal könnte es möglich sein, dass die Hormone die Permeabilität und Aktivität der Fermente beeinflussen, auf der anderen Seite könnten sie für die Fermentbildung verantwortlich sein. Er unterscheidet zwischen einer Beeinflussung des Fermentes selbst und der etwaigen Aktivatoren oder Inhibitoren, die das Ferment begleiten, ferner zwischen einer Beeinflussung des Substrates und Ferment-Substratkomplexes.

ABDERHALDEN (19) fasst die Hormone als Regulatoren des enzymatischen Geschehens auf. Wie diese Regulation vor sich gehen könnte, gibt er folgendermaßen an:

1.) "Die Hormone greifen direkt in die Bildung der Fermente ein, indem sie deren Synthese fördern oder hemmen.

2.) Sie bewirken eine Aktivierung oder Hemmung intakter

Enzyme, indem sie bestimmte Inhibitoren oder Aktivatoren ausschalten oder in Funktion setzen. Ihr Angriffspunkt kann dabei auch das Coferment des Enzyms sein.

3.) Sie beschleunigen oder hemmen den Abbau der Enzyme.

4.) Sie beeinflussen die Enzymreaktion indirekt, indem sie beispielsweise die Durchlässigkeit der Zellwände für die Substrate oder die Reaktionsprodukte der Fermente ändern (19) ".

Diese Möglichkeiten, an die bei der gegenseitigen Beeinflussung von Fermenten und Hormonen gedacht werden muss, lassen sich jedoch noch nicht bestätigen.

Fermente im Ovar und in der Follikelflüssigkeit:

Die Untersuchungen über die Fermente im Ovar wurden teils mit makroskopisch-chemischen Methoden, teils mit histochemischen Methoden durchgeführt. Sie beruhen im Prinzip alle auf dem Nachweis der durch das Ferment vom Substrat abgespaltenen Moleküle.

Die Fermente im Gesamtovar:

Bereits 1910 wurde von KNOBLANCK (20) die Abspaltung von Tyrosin aus Seidenpepton durch Ovarialgewebe festgestellt.

1912 wurde dann von LÖB und GUTMANN (21) das Ovar auf eine ganze Reihe von Fermenten untersucht. Das Ovarialgewebe (Schweineovarien) wurde nach einem besonderen Verfahren getrocknet und als Pulver dem Substrat zugesetzt. Dieses Pulver enthielt Katalase, die durch H_2O_2-Zersetzung nachgewiesen wurde, aber keine Peroxydase. Es spaltete weiterhin Stärke in Zucker auf, enthielt also "Diastase". Diese "Diastase" konnte in der enteiweißten Fraktion nachgewiesen werden. Invertase, Lactase und glykolytische Enzyme konnten nicht festgestellt werden. Die Spaltung von Lecithin

wurde durch Titration der freigesetzten Säure mit n/lo NaOH nachgewiesen. Eine fettspaltende Wirkung des Ovarialgewebes konnte durch Versuche mit Butter und reinem Tributyrin festgestellt werden (mit o,2%iger Sodalösung titriert). - Das Vorhandensein von Proteasen in dem Ovarialgewebe wurde mit drei verschiedenen Methoden bewiesen. Beim Nachweis der pepsinähnlichen Fermente wurde Casein 72 Std. bebrütet und nach KJELDAHL der Gehalt an N-Verbindungen geprüft. Die Versuche waren positiv.

Das Vorhandensein eines tryptisch wirkenden Ferments liess sich sowohl durch die Spaltung von Glycyltryptophan (Nachweis von Tryptophan mittels eines "Fermentdiagnostikum") wie durch die Bildung von Tyrosin aus Seidenpepton erkennen (Tyrosin wurde kristallin ausgefällt). Urease wurde ebenfalls gefunden.

Seit es möglich ist, Fermente histochemisch nachzuweisen, wurde auch das Ovar histochemisch auf Fermente geprüft und versucht, auf Grund ihrer topographischen Anordnung im Schnitt auf ihre Funktion zu schliessen.

MOSS, WRENN und SYKES (22) untersuchten 1954 histochemisch die Follikel des Rinderovariums auf ihren Gehalt an alkalischer Phosphatase. Nach den Beobachtungen dieser Autoren nimmt die Phosphatase des Follikelepithels mit dem Wachstum des Follikels ab, während sie in der Theca zunimmt. In mittleren und grösseren Follikeln besitzt die Granulosa mit Ausnahme des Eihügels keine Phosphataseaktivität.

WIMSATT (23) wies 1949 im Ovar der Fledermaus alkalische Phosphatase nach. Er konnte das Enzym in den Thecazellen und in den Endothelzellen des Corpus luteum sehr reichlich nachweisen, nicht aber in den Granulosazellen der Graafschen Follikel.

DEANE und WENDLER (24) fanden 1952, dass neben der Theca interna und dem Corpus luteum auch die Granulosa atretischer Follikel alkalische Phosphatase enthält und zwar erst mit dem Auftreten von Lipoiden. Dies bringt DEANE mit dem

Transport phosphorylierter Stoffe in Zusammenhang.

Phosphoamidase - ein Ferment, das die Bindung R.NH-P-O $(OH)_2$ hydrolysiert - wurde 1954 von NEUMANN, OEHLERT und HAUSMANN (25) histochemisch im Ovar gefunden. Es lässt sich im Stroma, in den Keimbläschen, in den Zellen der Granulosa und im Corpus luteum nachweisen. In der Follikelflüssigkeit konnte es nicht gefunden werden.

G.JUNG und E.KIDESS (26) fanden in Schweineovarien die höchste proteolytische Aktivität bei pH 3,5. Im Pepsinbereich konnten sie nur 23 % der Kathepsinaktivität messen. Tryptische Fermente waren nicht nachzuweisen. Die höchste spezifische Aktivität fanden sie in der Mitochondrien-Fraktion mit 3o3o Tyrosin/mg N/Std.. Im menschlichen Ovar fanden sie eine geringere Aktivität als im tierischen Gewebe.

Die Fermente in der Follikelflüssigkeit:

In der uns zugänglichen Literatur fanden wir über die Fermente in der Follikelflüssigkeit nur drei Arbeiten.

SCHOCHET (27) hat 1912 in einer Arbeit über den Mechanismus des Follikelsprunges Proteasen in der Follikelflüssigkeit gefunden. Als Material nahm der Autor steril gewonnene Follikelflüssigkeit aus Schweineovarien. Zum Vergleich untersuchte er Amnionflüssigkeit und Cystensaft. Als Substrat dienten Muskelstückchen oder Bindegewebe, die so lange ausgekocht und filtriert wurden, bis sie keine Reaktion mit Ninhydrin mehr gaben. Dann wurde Follikelflüssigkeit zugesetzt und 24 Std. bebrütet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels der Methode von ABDERHALDEN. SCHOCHET fand ein dem "Erepsin" ähnliches Ferment.

Die zweite Arbeit über die proteolytischen Fermente der Follikelflüssigkeit wurde 1943 von PETRY (28) verfasst. Auch er suchte nach einer Erklärung des Mechanismus des Follikel-

sprunges. Als Material wurde die Follikelflüssigkeit von Rindern und Schweinen genommen und als Substrat die Kuppe des gleichen Follikels benützt, aus dem die Follikelflüssigkeit stammte. Auch einzelne Schichten der Follikelwand: Innere Lamelle, äusserer Teil eines Follikels, äusserste Bindegewebsschicht des Follikels, Preßsaft der Follikelwand und deren Bindegewebsrückstand wurden als Substrat verwandt. Der Eiweißabbau konnte mit Hilfe der Methode von ABDERHALDEN nachgewiesen werden. Das Substrat wurde dabei so lange ausgekocht, bis das Filtrat keine Ninhydrinreaktion mehr ergab. - Bei 9o v. hundert Fällen wurden die Substrate von der Follikelflüssigkeit abgebaut. Zwischen Rinder- und Schweineovarien war kein Unterschied bemerkbar. Interessant ist das verschiedene Verhalten der Abbauwerte bei verschiedenen Substraten: Bei der Verwendung des grössten Teils der Follikelwand als Substrat fiel die Ninhydrinreaktion schwach aus. Verwandte man das grobe Bindegewebe, welches vom Preßsaft übrig war, als Substrat, so war die Reaktion deutlich positiv. Stark positiv fielen die Versuche jedoch aus, bei denen nur die Follikelkuppe zugesetzt wurde. Deshalb wurde die Follikelkuppe als spezifisches Substrat des Fermentes betrachtet.

G.JUNG und H.HELD konnten in der Follikelflüssigkeit Proteinasen, deren höchste Aktivität bei pH 3,5 lag, saure und alkalische Phosphatase sowie Esterase nachweisen (29). Sie fanden ausserdem, dass in kleinen Follikeln erheblich grössere Fermentmengen als in grossen Follikeln enthalten waren. Sie nehmen an, dass die Fermente der Follikelflüssigkeit in den Granulosazellen der Follikel gebildet werden.

Fermente im Corpus luteum

Nach MORI (3o) und Mitarbeiter sind die Zellen des Corpus luteum zu allen Zeiten reich an Oxydasen. Zur Zeit der höchsten Hormonproduktion ist die Dehydrogenaseaktivität im Corpus luteum am stärksten (FORAKER, A.G., P.A.GELL und S.W. DENHAM)(31). Weitere Fermenthinweise finden sich im Kapitel Gesamtovar (S.11).

Gewinnung von Zellfraktionen aus Corpus luteum:

Frisch geschlachteten Schweinen werden die Ovarien herausgenommen (geschnitten) und unter Eiskühlung so schnell wie möglich weiter verarbeitet. Die Follikel werden zunächst punktiert. Anschliessend werden die Corpora lutea bzw. rubra mit der Schere von Bindegewebe befreit und enukleiert. Das Gewebe wird dann gewogen und unter dauernder Kühlung mit der Schere so klein wie möglich zerschnitten. Unter Zusatz von 2 Gewichtsteilen 3o % Rohrzuckerlösung wird das Gewebe homogenisiert und anschliessend durch ein dichtes Tuch gepresst. Der so gewonnene Gewebssaft enthält die gesamten Zellbestandteile, die allerdings aus dem Zellverband herausgelöst sind. Nur ganz vereinzelt konnten intakte Zellen im Zellkernausstrich des Homogenats gefunden werden.

Ein Teil dieses Gewebssaftes (Homogenat) wird zur Bestimmung von Fermentaktivität abgenommen, der Rest mit 3 Teilen 3o % Rohrzuckerlösung vermischt. Dieses verdünnte Homogenat wird nun zunächst lo Min. bei 65o g zentrifugiert, dadurch kommen die Kerne zur Sedimentation.

Diese Zellkerne werden 2 mal in 3o % Rohrzuckerlösung aufgeschwemmt zentrifugiert und so gewaschen. Danach können sie in entsprechender Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zum Fermentansatz verwendet werden. Durch einen Ausstrich der Zellkerne, der zu Schnellkontrolle mit Methylenblau gefärbt wird, überzeugen wir uns, ob die gewonnenen Zellkerne weitgehend ungeschädigt durch die Manipulationen geblieben waren. Ein Kriterium hierfür ist das Erhaltenbleiben der Zellkernstruktur.

Der Überstand konnte nun entweder ebenfalls zu Fermentansätzen benutzt oder zur Gewinnung von Mitochondrien weiter bearbeitet werden. Hierzu wurden loo ml Überstand bei 24 ooo g in einer gekühlten Zentrifuge eine halbe Stunde zentrifugiert. Die so gewonnenen Mitochondrien (Sediment) mussten zur Fermentbestimmung ebenfalls mit physiologi-

scher Kochsalzlösung verdünnt werden.

Auch die als Überstand II zurückgebliebene Cytoplasmafraktion, die noch die Mikrosomen enthielt, wurde für die Fermentansätze verdünnt.

Nachdem ein kleiner Teil von Überstand II zum Fermentansätzen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, zentrifugierten wir den Rest 2 Std. bei 41ooo g in der gekühlten Ultrazentrifuge und erhielten so den Überstand III und die Mikrosomen (Sediment). Diese wurden mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und für die Fermentansätze verwendet.

In dieses Schema der Aufarbeitung haben wir einen weiteren Arbeitsgang eingeschaltet. Das zerkleinerte Gewebe wurde vor dem Homogenisieren im Porzellanmörser zusätzlich zerquetscht. Dadurch wurde die Homogenisierung des Gewebes wesentlich erleichtert.

Tabelle 1: Verdünnungen der als Fermentlösung verwendeten Gewebsfraktionen für Erzielung eines linearen Reaktionsverlaufes mit den in der Arbeit verwendeten Abkürzungen und den Inkubationszeiten

		Corpus luteum		Corpus rubrum
		Proteinasen	Phosphatasen	
Ho	= 33,3%iges bindegewebsfreies Homogenat in 3o%iger Rohrzuckerlösung	1 ml ad 5o-1oo ml	1 ml ad 5-1o ml	1 ml ad 2o ml
K_3	= Zellkerne aus 2o g Gewebe	ad 25-5o ml	ad 1o-2o ml	aus 15 g Gewebe ad 25 ml
Mit	= aus 1oo ml zellkernfreiem 8,3%igem Homogenat	ad 5o-1oo ml	ad 25 ml	ad 1oo ml
Micr	= Mikrosomen, Sediment aus 1oo ml zellkern- und mitochondrienfreiem 8,3%igem Homogenat bei 45ooo g/min	ad 1oo ml	-	-
$Ü_2$	= Zytoplasma mit Microsomen	1 ml ad 2o ml	1 ml ad 5 ml	1 ml ad 1o ml
$Ü_3$	= Zytoplasma ohne Microsomen	1 ml ad 2o ml	-	-
	Inkubationszeit	2o und 45 min	45 und 9o min	2o und 45 min

Nachweis der proteolytischen Fermentaktivität:

Die Messung der proteolytischen Aktivität erfolgte nach der Methode von ANSON. Hierbei wird eine Rinderhämoglobinlösung als Substrat verwendet und mit geeigneten Pufferlösungen in bestimmten pH-Bereichen bei einer Temperatur von 37°C mit der zu untersuchenden Fermentlösung inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wird der Fermentansatz durch Zugabe eines Eiweissfällungsmittels, z.B. Trichloressigsäure (TCE), unterbrochen. Im Überstand, den man durch Zentrifugieren gewinnen kann oder im klaren Filtrat können nun mit dem Phenolreagens nach FOLLIN die freigesetzten Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan durch Anfärbung im Photometer gemessen werden.

Mit Hilfe einer Eichkurve lassen sich die abgebauten Aminosäuremengen genau feststellen.

Bei unseren Versuchen wurden folgende Lösungen verwendet:

1.) Substrat: 2,5 % Rinderhämoglobin (Merck)
2.) Fermentlösung: Gewebshomogenate und Fraktionen in Verdünnung mit o,9 % NaCl (siehe Tab. 1),
Lösungen von kristallinem Pepsin und Trypsin zum Einarbeiten.
3.) Puffer
pH 1,6 o,2m Glycocoll-HCl
pH 3,5 o,2m Na-acetat-Essigsäure
pH 4,1 o,2m Na-acetat-Essigsäure
pH 7,4 o,2m prim. + sekund. Phosphat nach SÖRENSEN
4.) lo% TCE-Lösung zur Unterbrechung der Enzymreaktion.

Die Inkubation unseres Reaktionsgemisches erfolgte in Wasserbad bei 37° C. Als Inkubationszeiten wurden o,2o und 45 Min. gewählt.

Substrat, Puffer und H_2O wurden zunächst 1/4 Std. in Wasserbad inkubiert, um so die Reaktionstemperatur von 37° C zu erreichen. Das gleiche geschah mit den Fermentlösungen. Dem α-Wert wurde schon vor Zugabe der Ferment-

lösung TCE zugesetzt. Bei allen Versuchen erfolgte eine Leerwertbestimmung für die Fermentlösung in Ansätzen, die kein Substrat enthielten.

Im einzelnen setzte sich ein Ansatz aus folgenden Mengen zusammen:

1. 1 ml Substrat
2. 2 ml Puffer
3. 1 ml Ferment
4. 1 ml H_2O

Inkubation

5. 2 ml 1o% TCE-Lösung

Bestimmung von Tyrosin:

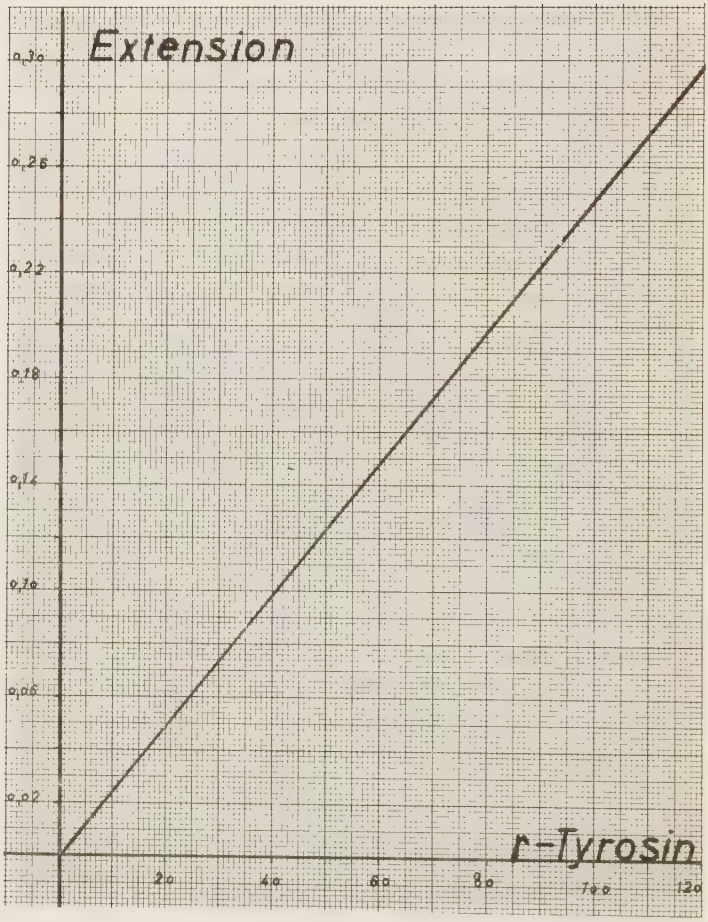
Der unterbrochene Fermentansatz wurde filtriert und aus dem klaren Filtrat 2 ml zur Tyrosinbestimmung entnommen. Diese pipetierten wir in ein 25 ml Kölbchen, die 5 ml 14 % Sodalösung enthielten. Dazu kam ein 1 ml Folinreagens, das 1:3 mit H_2O verdünnt war, dann wurde mit H_2O auf 25 ml aufgefüllt.

Im Photometer Elko II erfolgte bei Filter S-72 E 45 die Messung gegen Leerwert aus Sodalösung und Folinreagens. Für unsere Messungen benutzten wir 1 cm Cuvetten. Die Erreichnung der freigesetzten Tyrosinmenge erfolgte nach einer mit l-Tyrosin angelegten Eichkurve.

Eichkurve:

Zur Anfertigung der Eichkurve wurde 1 g Tyrosin in 1 Liter Wasser gelöst und durch Verdünnung Lösungen hergestellt, die 5 bzw. 1o Tyrosin in 1 ml enthielten. Für die Eichkurve wurden die Extinktionswerte von 5, 1o, 2o, 3o, 4o, 5o und 1oo Tyrosin gemessen und in einem Ordinatensystem aufgetragen.

Abb.I: Eichkurve für Tyrosin



I - A - Saure Phosphatase:

Die Messung der sauren Phosphataseaktivität erfolgte nach der Methode von HUDSON und LONDON (32). Hierbei wird Na_2-ß-Glycerophosphat als Substrat benutzt und in dem freigesetzten Phosphat Phosphor photometrisch gemessen. Die Bestimmung des Phosphors wurde nach LOHMANN und JENDRASSIK (33) durchgeführt.

Im einzelnen wurden folgende Versuchsanordnung angewandt:

1. Als Substrat wurden 41o mg $MgCl_2$ + $6H_2O$ und 5oo mg Na_2-ß-Glycerophosphat im Wasser aufgelöst und dazu 8o ml Acetatpuffer pH 5,o gegeben. Mit H_2O wird auf 1oo ml aufgefüllt.
2. Die Fermentlösung setzte sich aus den oben angegebenen Gewebsextrakten zusammen.
3. Zur Unterbrechung der Fermentreaktion wurde eine 3o % Trichloressigsäure verwendet.

Im einzelnen bestand der Fermentansatz aus:

1.	4 ml Substratpuffer	
2.	1 ml Ferment	
		Inkubation
3.	1 ml 3o % TCE-Lösung	

Die Bebrütung erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Inkubationszeiten waren 0, 45 und 90 Min.

B - Alkalische Phosphatase:

Zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase haben wir die Methode von JENNER und KAY (34) benutzt.

1. Hierzu wird eine Substrat-Puffer-Lösung aus 0,2 m Glycocoll-NaOH-Puffer pH 9,o und eine 2,5%ige Na_2-ß-Glycerophosphat-Stammlösung hergestellt. Die Substrat-Puffer-Lösung muss vor jedem Ansatz frisch angesetzt werden. Dazu werden ein Teil Stammlösung und 5 Teile Puffer mit-

einander vermischt.

2. Die Unterbrechung der Fermentreaktion erfolgt mit einer 15 % Trichloressigsäure.

Ein Fermentansatz zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase setzte sich wie folgt zusammen:

1. 5 ml Substrat-Puffer-Lösung
2. 1 ml Ferment

Inkubation

3. 2 ml 15 % TCE-Lösung

Die Bebrütung wurde wiederum im Wasserbad bei 37° C durchgeführt. Als Inkubationszeit wurden Zeiten von 0, 45 und 9o Min. gewählt.

Phosphatbestimmung:

Sowohl bei der sauren als auch bei der alkalischen Phosphataseuntersuchung wurde die Bestimmung der freigesetzten Phosphatmengen nach einer Methode von LOHMANN und JENDRASSIK (33) durchgeführt.

Als Reagenzien werden für die Methode eine 2,5%ige Ammon-Molybdat-Lösung in 5 n H_2SO_4 und eine Amidollösung, die nach Vorschrift bereitet wurde, benötigt.

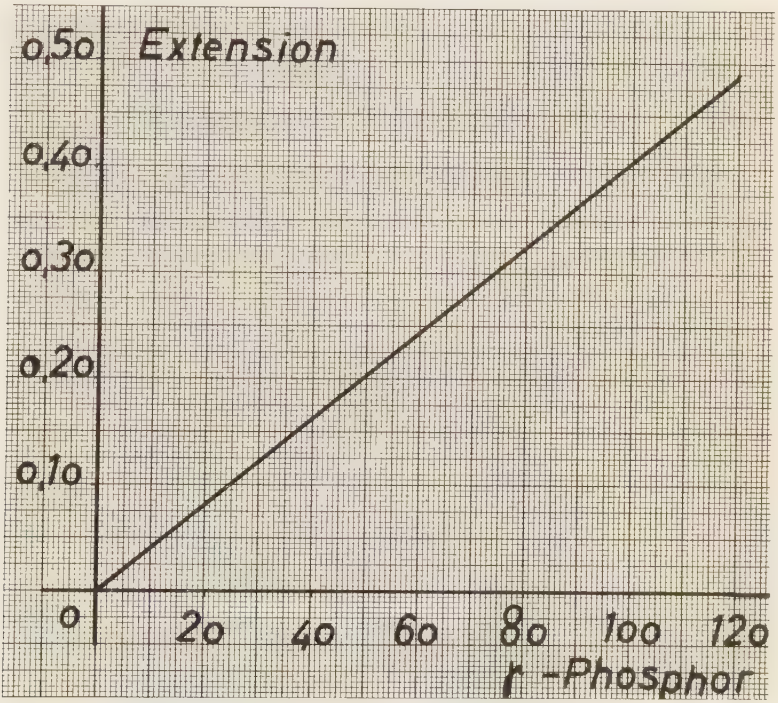
Im einzelnen wurden 2 ml vom Filtrat des Fermentansatzes mit 5 ml Ammon-Molybdat und 1 ml Amidollösung in 25 ml Meßkölbchen gefüllt und mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 25 ml gebracht. Die Kölbchen mussten nun 7 Min. bei 37° C und dann 7 Min. bei 2o° C gehalten werden. Die in saurem Milieu durch Reaktion von Phosphat mit Ammon-Molybdat auftretende blaue Farbe konnte im Photometer Elko II bei Filter j 61,7 - 55 gemessen werden. Die freigesetzten Mengen Phosphor wurden aus einer Eichkurve abgelesen.

Eichkurve:

Zur Herstellung einer Eichkurve wurden o,439o g trockenes KH_2PO_4 in 1 Liter Wasser aufgelöst. Diese lo mg % Phosphorlösung wurde weiter verdünnt bis in 1 ml lo - loo Phosphor enthalten waren.

Durch Messung von verschiedenen Phosphorkonzentrationen zwischen lo und loo konnte folgende Eichkurve festgesetzt werden:

Abb.2: Eichkurve für Phosphatasebestimmung



Stickstoffbestimmung:

Um die Aktivität der einzelnen Fraktionen und Versuche vergleichen zu können, haben wir den Stickstoffgehalt als Bezugsgrösse bestimmt.

Die Stickstoffbestimmung wurde nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren durchgeführt, durch das der Stickstoffwert in 1 ml der betreffenden Fermentlösung errechnet wird.

Vorarbeiten:

Um mit Fermentreaktionen vertraut zu werden, wurden zunächst Untersuchungen mit kristallinen Fermenten durchgeführt. Wir benutzten Pepsin- und Trypsinlösungen. Ihre Einwirkungsmöglichkeit auf Hämoglobin wurde in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet.

Abb.3: Abbau einer 5%igen Hämoglobinlösung durch Trypsin

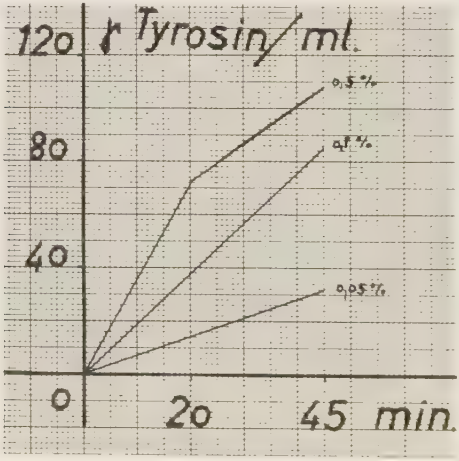
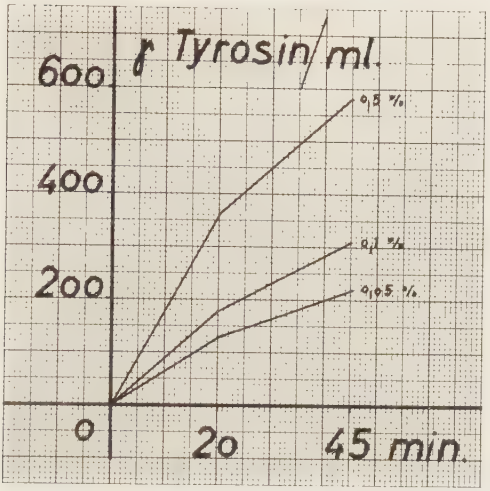


Abb.4: Abbau einer 5%igen Hämoglobinlösung durch Pepsin.



Ergebnisse:

Alle Ergebnisse unserer Untersuchungen wurden von uns graphisch dargestellt, um so den Verlauf der Fermentreaktion beurteilen zu können.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt immer auf dem N-Gehalt der Fermentlösung, damit so für alle Untersuchungen vergleichbare Resultate erreicht wurden.

Ausgangswert der Berechnung bei allen Fällen der Proteinase-Bestimmung ist das gemessene Ergebnis nach 2o Min., bei Phosphatase-Bestimmung das Ergebnis nach 45 Min. Die in unseren Tabellen angegebenen Werte sind die aus diesen Meßergebnissen errechneten Stundenwerte.

Von jedem einzelnen Versuch wurde eine Übersicht über die N-Bilanz und die Aktivitäts-Bilanz angefertigt. So konnte kontrolliert werden, ob bei den durchgeführten Fermentansätzen keine Fehler durch Aktivitätsverluste bei den einzelnen Herstellungsvorgängen eingetreten waren.

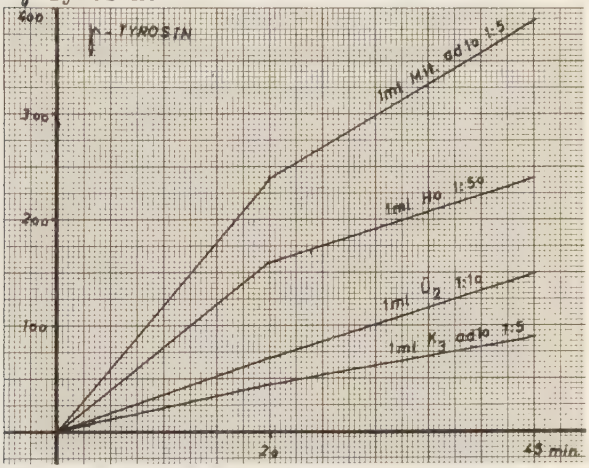
Insgesamt wurden für die einzelnen Bestimmungen folgende Untersuchungen durchgeführt:

Corpus luteum:	Proteinasen	saure Phospahtase	
	11	5	
	alkalische Phosphatase		
	5		
Corpus rubrum:	Proteinasen	saure Phosph.	alk.Phosph.
	1	-	-

Proteinasebestimmung im Corpus luteum von Schweinen bei pH 3,5.

1.Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm homogenisiert, 32 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 5: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Tyrosin.

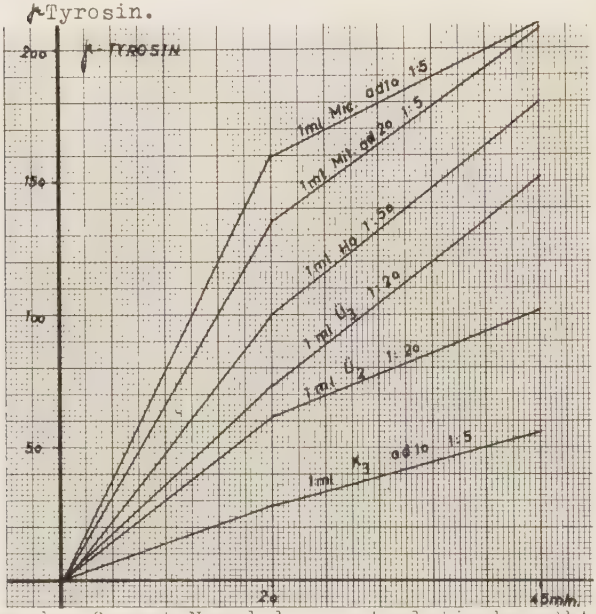


Tab.2 : Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% d.Homogenats	γ-Tyrosin/Std.	% d.Homog.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	3,61o	1oo	13 65o	1oo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,1o1	2,7	291	2,1
Mitochondrien	o,38o	1o,5	1 41o	1o,3
Überstand($Ü_2$)	3,13o	86,7	1o 65o	78,o
	3,611	99,9	12 351	9o,4

2.Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm homogenisiert, 32,5 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 6: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Tyrosin.

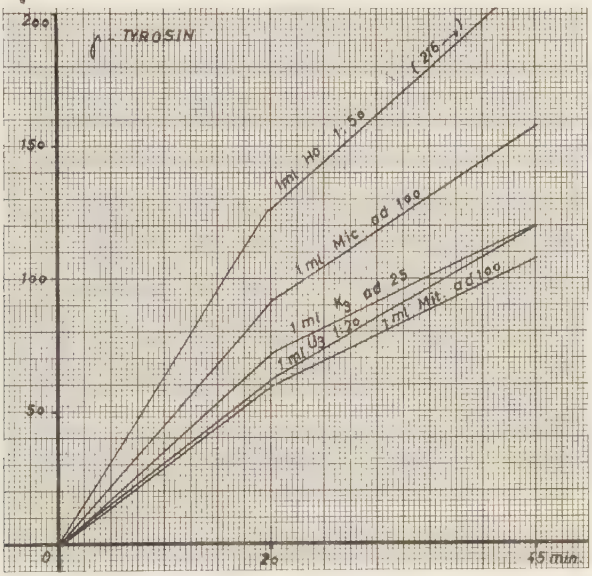


Tab.3: Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt mg-N	Stickstoffgehalt % d.Homogen.	Kathepsinaktivität angegeben in γ-Tyrosin/Std.	Kathepsinaktivität % d.Homog.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	3,53o	1oo	23 1oo	1oo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o72	2,o	171	o,7
Mitochondrien	o,428	12,1	1 635	7,1
Mikrosomen	o,146	4,1	954	4,1
Überstand (U_3)	2,8oo	79,o	2o 43o	88,5
	3,446	97,2	23 19o	1oo,4

3.Versuch: Aus 15 g Corpora lutea und 45 ccm R-Zuckerlösung wurden 4o ccm Homogenat gewonnen, 25 ccm davon wurden zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen benutzt.

Abb.7: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Tyrosin.

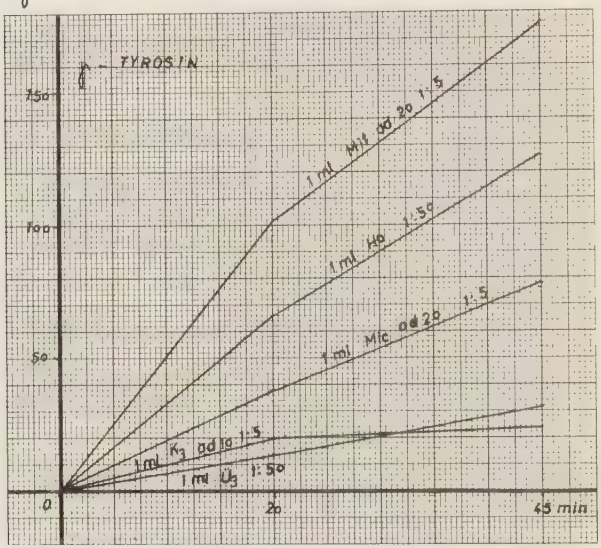


Tab.4: Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% d.Homogen.	γ-Tyrosin/Std.	% d.Hom.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	3,8oo	1oo	17 7oo	1oo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o87	2,28	258	1,5
Mitochondrien	o,136	3,5	72o	4,1
Mikrosomen	o, 248	6,5	1 116	6,3
Überstand ($Ü_3$)	3,2oo	84,2	14 4oo	81,4
	3,671	96,48	16 494	93,3

4.Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm homogenisiert, 58 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 5o ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 8: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in μ-Tyrosin.

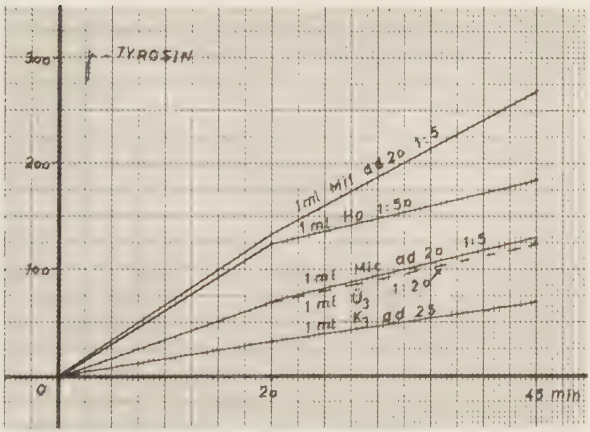


Tab.5: Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% d.Homogen.	μ-Tyrosin/Std.	% d.Hom
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	2,8oo	1oo	9 9oo	1oo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o34	1,2	63	o,6
Mitochondrien	o,146	5,2	75o	7,5
Mikrosomen	o,168	6,o	252	2,5
Überstand ($Ü_3$)	2,ooo	71,4	9 ooo	9o,9
	2,348	83,8	1o o65	1o1,5

5.Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm einer 3o % Rohrzuckerlösung homogenisiert, 32 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 9: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Tyrosin.

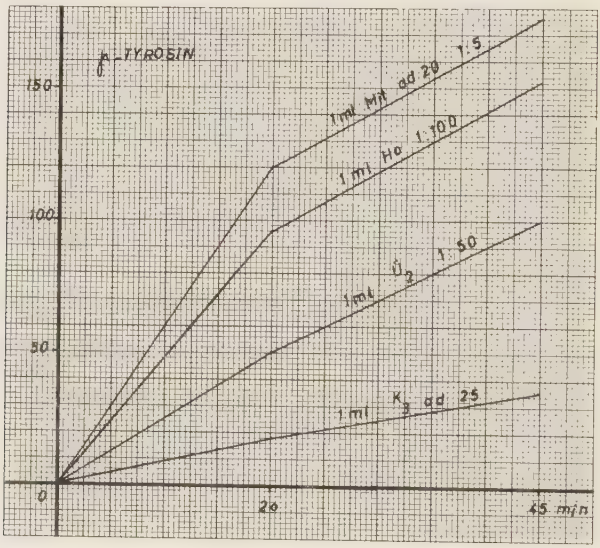


Tab. 6: Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% d.Homogen.	γ-Tyrosin/Std.	% d.Homog.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	3,o75	loo	18 45o	loo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o73	2,37	99	o,5
Mitochondrien	o,157	5,1	1 623	8,7
Mikrosomen	o,134	4,3	861	4,6
Überstand ($Ü_3$)	2,7oo	87,8	17 4oo	94,3
	3,o64	99,57	19 983	1o8,1

6. Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm homogenisiert, 34 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. lo: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Tyrosin.



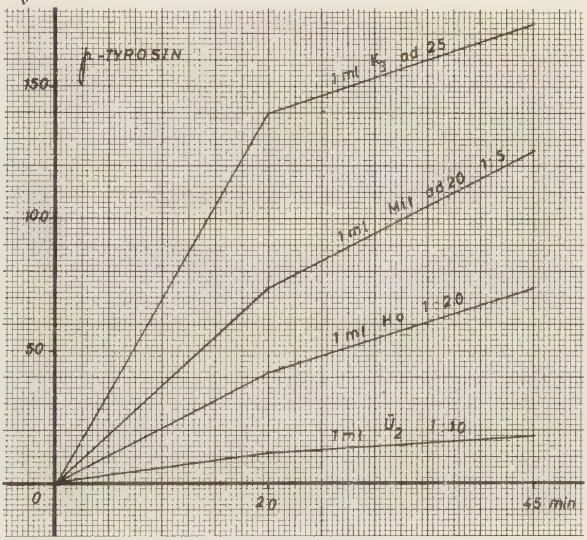
Tab.7: Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% d.Homogen.	γ-Tyrosin/Std.	% d.Homogen.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	2,95	loo	21 3oo	loo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o53	1,7	54	o,3
Mitochondrien	o,2oo	6,7	1 44o	6,8
Überstand ($Ü_2$)	2,ooo	67,7	19 35o	9o,8
	2,253	76,9	2o 844	97,9

Proteinasebestimmung im Corpus rubrum

1. Versuch: Aus 25 g Corpora rubra wurden, mit 5o ccm 3o% Rohrzuckerlösung homogenisiert, 54 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 4o ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 11: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Tyrosin.



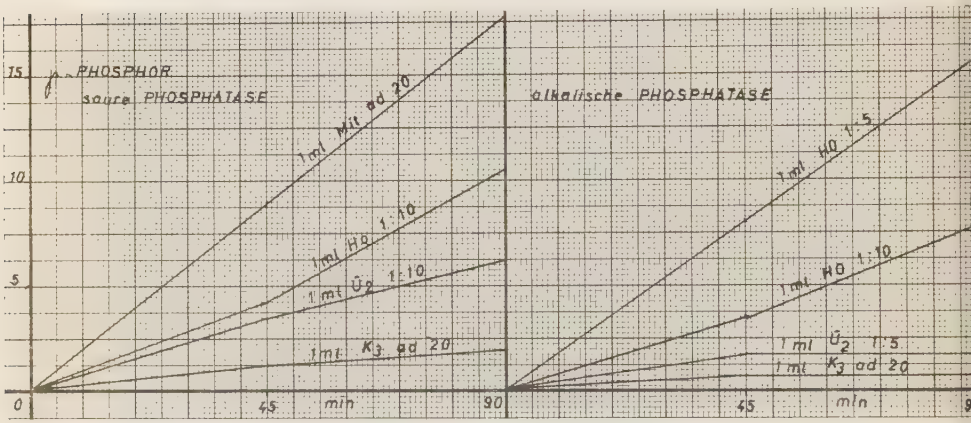
Tab.8: Verteilung des Gesamt-N und der proteolytischen Aktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus rubrum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% d.Homogen.	γ-Tyrosin/Std.	% d.Homog.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	6,94o	loo	1 515	loo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,735	lo,6	114	7,5
Mitochondrien	o,435	6,3	474	31,3
Überstand($Ü_2$)	5,6oo	8o,8	912	6o,2
	6,77o	97,7	1 5oo	99,o

Phosphatasebestimmung im Corpus luteum

1. Versuch: Aus 15 g Corpora lutea wurden, mit 45 ccm 3o % Rohrzuckerlösung homogenisiert, 44 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 3o ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb.12: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Phosphor.

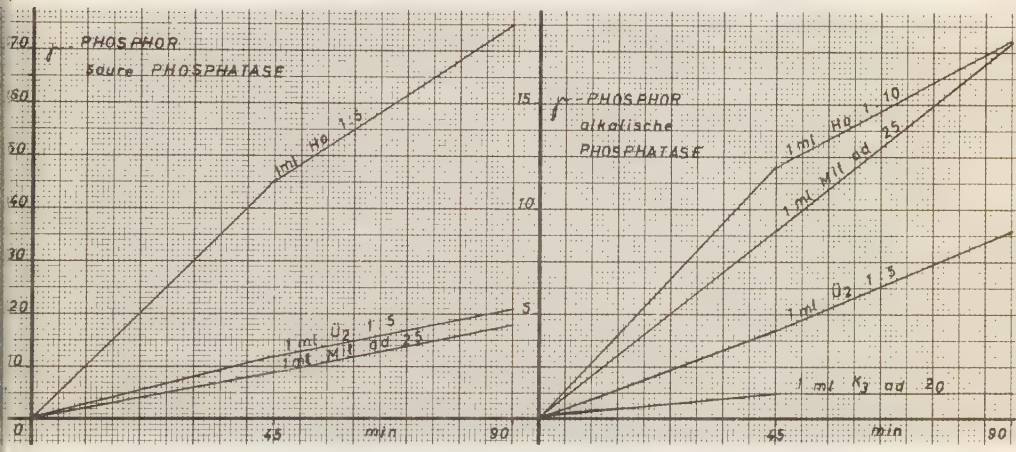


Tab.9: Verteilung des Gesamt-N und der sauren und alkalischen Phosphatase-Aktivität in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Saure Phosphataseaktivität bei pH 5,o angegeben in		Alkalische Phosphataseaktivität bei pH 9,o angegeben in	
	mg-N	% des Homogenates	γ-Phosphor/ 1 Std.	% des Homogenates	γ-Phosphor/ 1 Std.	% des Homogenates
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohr-Zuckerlsg.	2,39o	loo	129	loo	49	loo
daraus gewonnen:						
Zellkerne	o,o5o	2,1	1	o,8	-	-
Mitochondrien	o,19o	7,9	12	9,3	-	-
Überstand ($Ü_2$)	2,o8o	87,o	13o	loo,6	44	89,8
	2,32o	97,o	143	11o,7	44	89,8

2.Versuch: Aus 15 g Corpora lutea wurden, mit 45 ccm 3o % Rohrzuckerlösung homogenisiert, 44 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 3o ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb.13: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Phosphor.

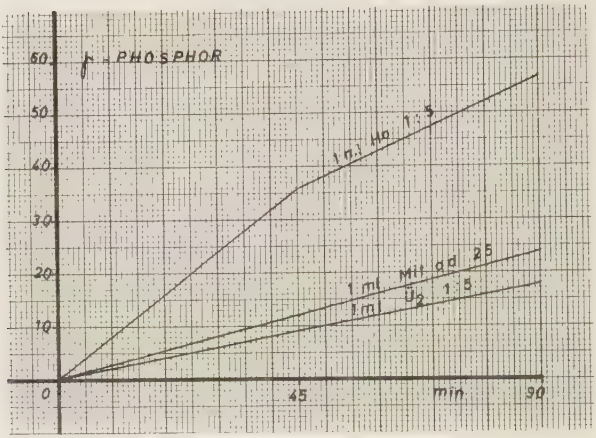


Tab. 1o: Verteilung des Gesamt-N und der sauren und alkalischen Phosphatase-Aktivität in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Saure Phosphataseaktivität bei pH 5,o angegeben in		Alkalische Phosphataseaktivität bei pH 9,o angegeben in	
	mg-N	% des Homogenates	γ-Phosphor/ 1 Std.	% des Homogenates	γ-Phosphor/ 1 Std.	% des Homogenates
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohrzuckerlsg.	2,16o	1oo	3oo	1oo	127	1oo
daraus gewonnen:						
Zellkerne	o,o26	1,2	-	-	1	0,8
Mitochondrien	o,17o	7,8	9	3	9	7,1
Überstand($Ü_2$)	1,96o	9o,7	294	98	113	89,o
	2,156	99,7	3o3	1o1	123	96,9

3.Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm 3o % Rohrzuckerlösung homogenisiert, 36 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 14: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Phosphor.

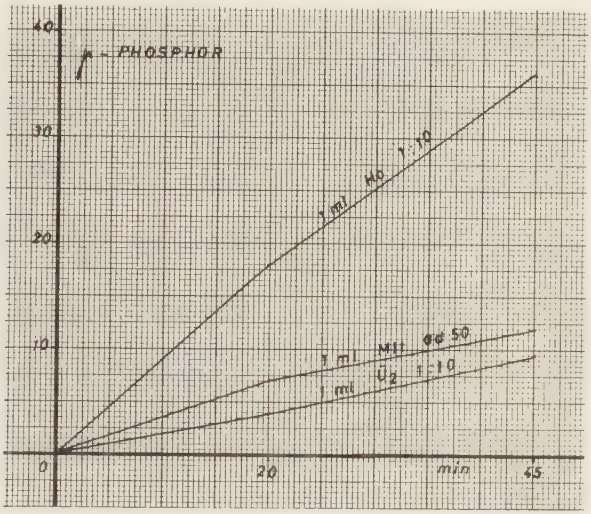


Tab. 11: Verteilung des Gesamt-N und der sauren Phosphatase-Aktivität in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Phosphataseaktivität bei pH 5,o, angegeben in	
	mg-N	% des Homogenats	γ Phosphor	% des Homogenats
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohrzuckerlsg.	2,64o	loo	246	loo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o85	3,2	-	-
Mitochondrien	o,2o4	7,7	16	6,5
Überstand ($Ü_2$)	2,46o	93,1	248	loo,8
	2,749	lo4,o	264	lo7,3

4,Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm 3o % Rohrzuckerlösung homogenisiert, 37 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb. 15: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Phosphor.

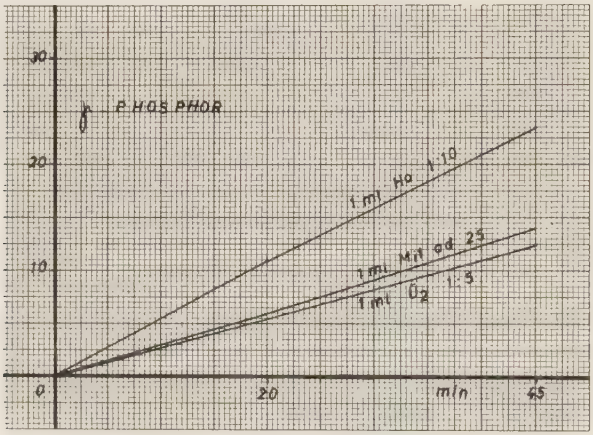


Tab.12: Verteilung des Gesamt-N und der sauren Phosphatase-Aktivität in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Phosphataseaktivität bei pH 5,o angegeben in	
	mg-N	% des Homogenats	γ-Phosphor	% des Homogenats
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohrzuckerlsg.	2,58o	loo	534	loo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o37	1,4	-	-
Mitochondrien	o,178	6,8	31	5,8
Überstand ($Ü_2$)	2,16o	83,7	496	93,o
	2,375	91,9	527	98,8

5.Versuch: Aus 2o g Corpora lutea wurden, mit 4o ccm 3o % Rohrzuckerlösung homogenisiert, 32 ccm Homogenat gewonnen. Davon wurden 25 ccm zur weiteren Extraktion der Zellfraktionen verwendet.

Abb.16: Verlaufskurve der gemessenen Enzymaktivität in γ-Phosphor.



Tab.13: Verteilung des Gesamt-N und der sauren Phosphatase-Aktivität in der Zelle des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Phosphataseaktivität bei pH 5,o angegeben in	
	mg-N	% des Homogenats	γ Phosphor	% des Homogenats
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohrzuckerlsg.	2,16o	loo	397	loo
daraus gewonnen:				
Zellkerne	o,o36	1,6	-	-
Mitochondrien	o,191	8,8	19	4,8
Überstand ($Ü_2$)	1,74o	8o,5	325	81,8
	1,967	9o,9	344	86,6

In Tabelle 14 ist die Gesamtaktivität in der Zelle des Corpus luteum aus 7 Versuchen zusammengestellt, desgleichen in der Tabelle 15 die Gesamtaktivität der sauren und alkalischen Phosphatase aus 4 Versuchen.

Tab.14: Gesamt-N und Kathepsinaktivität bei pH 3,5 in der Zelle des Corpus luteum -Mittelwert aus 7 Versuchen-

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Kathepsinaktivität angegeben in	
	mg-N	% des Homogenats	γ Tyrosin/ Std.	% des Homogen.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohrzuckerlsg.	3,26o	loo	18 9oo	loo
daraus gewonnen:				
Kerne	o,o7o	2,1	159	o,8
Mitochondrien	o,2o9	6,4	1 55o	8,2
Mikrosomen	o,174	5,3	1 14o	6,o
Überstand ($Ü_3$)	2,766	84,8	16 o5o	85,o
	3,219	98,6	18 89o	loo,o

Tab.15: Gesamt-N und Gesamtaktivität von saurer und alkalischer Phosphatase in der Zelle des Corpus luteum -Mittelwert aus 4 Versuchen-

Zellfraktion	Stickstoffgehalt		Saure Phosphatase bei pH 5,o angegeben in		Alkalische Phosphatase bei pH 9,o angegeben in	
	mg-N	% des Homogen.	γ Phosphor /Std.	% des Homog.	γ Phosphor/ Std.	% des Homog.
1 ml Homogenat 1:3 in 3o % Rohrzuckerlsg.	2,39o	loo	4oo	loo	99	loo
daraus gewonnen:						
Kerne	o,o5o	2,1	-	-	-	-
Mitochondrien	o,19o	8,o	18	4,5	4	4
Überstand ($Ü_2$)	2,o8o	86,9	4o2	loo,5	91	92
	2,32o	97,o	42o	1o5	95	96

Diskussion

Wie schon erwähnt, ist die spezifische Aktivität der Proteinasen bei pH 3,5 im Gesamtovargewebe ausserordentlich hoch und beträgt wie JUNG und E.KIDES feststellten, für das Homogenat 1 134 γ-Tyrosin/mg N/Std.. Die höchste Aktivität fand sich in der Mitochondrienfraktionen mit 3 030 γ-Tyrosin/mg N/Std.. Diese Aktivität wird von den Hydrolasen des Corpus luteum noch weit übertroffen. Wir fanden nämlich eine durchschnittliche proteolytische Enzymaktivität bei pH 3,5 von 6 420 γ-Tyrosin/mg N/Std. im Homogenat. In der Mitochondrienfraktion konnte die absolut höchste Kathepsinaktivität mit 12 960 γ-Tyrosin/mg N/Std. gemessen werden.

Es fiel auf, dass an einzelnen Versuchstagen die Aktivität der verschiedenen Fraktionen ausserordentlich schwankte. Z.B. wurden in der Mitochondrienfraktion Abbauwerte von 3 840 γ-Tyrosin bis 12 960 γ-Tyrosin/mg N/Std. gemessen. Diese Schwankung scheint abhängig zu sein vom Alter des Corpus luteum, denn im Corpus rubrum findet sich eine erheblich niedrigere Enzymaktivität als im Corpus luteum.

Wir müssen deshalb annehmen, dass im Corpus luteum die proteolytische Aktivität dem Alter entsprechend zunimmt. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen am Follikel. Hier konnten JUNG und HELD (29) nachweisen, dass reife Follikel eine erheblich niedrigere Enzymaktivität als kleine Follikel hatten.

Tab.16: Spezifische Kathepsinaktivität einzelner Gewebsfraktionen im Corpus rubrum und Corpus luteum (angegeben ist die Aktivität /mg N/Std. bei pH 3,5 in γ-Tyrosin)

Fraktion	Corpus rubrum	Corpus luteum
Ho	363	6 42o
K_3	144	2 o82
Mit	1 293	7 4o4
Micr	-	6 54o
$Ü_2$	258	6 24o
$Ü_3$	-	6 268

Diese hohe von uns gemessene Aktivität im Corpus luteum liegt erheblich über bisher bekannten Werten anderer Organe und auch erheblich über im eigenen Labor festgestellten Aktivitäten weiterer endokriner Organe. Das Organ, das in seiner proteolytischen Aktivität dem Ovar am nächsten kommt, ist die Nebenniere mit einer spezifischen Aktivität von 2 77o γ-Tyrosin/mg N/Std. im Gesamthomogenat (35).

Leider ist es nicht möglich, auf chemischem Wege zwischen Funktionsstufen und Alter des Corpus luteum zu unterscheiden und nur der Vergleich mit den Ergebnissen aus dem Corpus rubrum lässt den Schluss zu, dass das Alter des Corpus luteum für den Fermentgehalt eine Rolle spielt. Die Verschiebung der intrazellularen Verteilung der Proteasen in der Zelle, wie sie zwischen Corpus rubrum und Corpus luteum festzustellen ist, lässt auch eine Funktionsänderung der Enzyme annehmen. Während nämlich im Corpus rubrum die Mitochondrienfraktion 31,3 % der Zellaktivität enthält, finden wir im Corpus rubrum höchstens 9 % der Gesamtzell-

aktivität an Proteinasen wieder. Im Corpus rubrum ist diese Aktivität fünffach so hoch wie der Anteil am N-Gehalt der Zelle, während im Corpus luteum der N-Gehalt der Mitochondrienfraktion in etwa der Enzymaktivität entspricht.

Auch diese Untersuchungsergebnisse bestätigen die schon früher von JUNG und HELD (29) und JUNG und E.KIDESS (26) geäusserte Ansicht, dass Proteinasen, in diesem Fall der Kathepsinkomplex, im Ovar anscheinend eine besondere Funktion zu erfüllen haben und nicht nur für den normalen Zellstoffwechsel zuständig sind. Worin diese spezifische Aufgabe besteht, lässt sich noch nicht sicher sagen. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung erforderlich.

Herrn Dr.P.A.König, Wissenschaftlicher Assistent der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, danke ich an dieser Stelle für die histologische Beurteilung der untersuchten Gewebe.

Fräulein Wiedemann möchte ich für ihre Hilfe bei der Stickstoffbestimmung herzlich danken.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst in einer Literaturzusammenstellung das wesentlichste über die bisher bekannten Eigenschaften der Fermente, insbesondere der Proteasen und Phosphatasen berichtet.

Dann erfolgt eine Zusammenstellung der bisher erfolgten Fermentuntersuchungen im Gesamtovar, im Liquor folliculi und im Corpus luteum.

Bei den eigenen Untersuchungen, die am Corpus luteum und Corpus rubrum ausgeführt wurden, erfolgte die Gewebsextraktgewinnung nach der Methode von LANG und SIEBERT. Die proteolytische Enzymaktivität wurde nach der ANSON-Methode, die Aktivität der sauren Phosphatase nach den Angaben von HUDSON und LONDON und die der alkalischen Phosphatase nach JENNER und KAY bestimmt.

Im Corpus luteum findet sich eine ausserordentlich hohe Enzymaktivität, die in 1 ml Homogenat 18 900 γ-Tyrosin/Std. beträgt. Dagegen ist die Aktivität im Corpus rubrum nur kanpp 1/10 so hoch und beträgt für 1 ml Homogenat 1 515 γ-Tyrosin/Std.

Die Aktivität der sauren Phosphatase ist fast 4 mal so hoch wie die der alkalischen Phosphatase. Für die saure Phosphatase fand sich im Homogenat eine Aktivität von 400 γ-P/Std./1 ml Ho, für die alkalische Phosphatase eine Aktivität von 99 γ-P/Std./1 ml Ho.

Die Verteilung in der Zelle ist für alle Fermente in etwa gleich. Der Hauptanteil findet sich in der Zytoplasma-Mikrosomenfraktion.

Die gefundenen Ergebnisse werden diskutiert. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass die proteolytischen Fermente in einer besonderen Beziehung zu den Proteohormonen der Hypophyse stehen könnten.

Literaturverzeichnis

Abderhalden, R. (19) Klinische Enzymologie. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1958)

Anson, L. (14) The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain and Cathepsin with Hemoglobin. J. gener. Physiol. 22, 79 (1939)

Bergmann, M., H. Fraenkel-Conrat (9) The Role of Specifity in the Enzymatic Synthesis of Proteins. J. Biol. Chem. 119, 707 (1937)

Bergmann, M., J. S. Fruton (12) Intracellular Proteolytic Enzymes of Animal Tissue. Adv. Enzym. I, 80 (1941)

Chow, B. F. (16) The Purification and Properties of certain Protein Hormones. Adv. Protein Chem. I, 153 (1944)

Deane, H. (24) Histochemical oberservations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. Amer. J. Anat. 91, 363 (1952)

Dirscherl, W. (18) Über die Einwirkung von Steroid-Hormone auf Gewebsstoffwechsel und Fermente. Erg. Physiol. 48, 112 (1955)

Foraker, A. G., P. A. Cell and S. W. Denham (31) Dehydrogenase activity. I. In the ovary. Obstr. a. Gynec. 2, 407-413 (1953)

Freudenberg, E. (5) Über das Kathepsin des menschlichen Magensaftes. Enzymologia 8, 385 (1940)

Goldstein, B., M. Gintsbourg (8) Proteinase (Cathepsin) in the Tissue of the Chicken Embryo. Enzymologiea I, 369 (1936)

Hedin, S. G. S. Rowland (4) Untersuchungen über das Vorkommen von proteolytischen Enzymen im Tierkörper. Z. f. Physiol. Chem. 32, 531 (1901)

Hudson, B. P., M. London (32) Studies on the purifications of acid prostatic phosphatase. Arch. Biochem. 46, 141 (1953)

Jenner, H. D., H.D. Kay — (34) In Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der Physiol. und pathologisch-chemischen Analyse Bd. V, S. 176. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer-Verlag 1953.

Jung, G., H. Held — (29) Über die Fermente in der Follikelflüssigkeit. Arch. f. Gyn. 192, 146-150 (1959)

Jung, G., E. Kidess — (26) Proteolytische Fermente im Ovargewebe. Arch. f. Gyn. 192, 151-154 (1959)

Jung, G., G. Nusslein — (35) Untersuchungen über proteolytische Fermente in endokrinen Organen. z. Zt. im Druck.

Knoblanck, A. — (20) Über die Abspaltung von Tyrosin aus Seidenpepton durch Ovarialgewebe. Biochem. Zeitschrift 29, 102 (1910)

Lang, K. — (6) Biochemie des intermediären Stoffwechsels. Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. IV, 2. Teil, S. 324. Berlin-Göttingen-Heidelberg (Springer-Verlag) 1957.

Lang K., E. Wegener — (15) Nachweis der Komplexen Natur des Kathepsins und Beitrag zur Reinigung einer Komponente (Kathepsin T). B. Z. 318, 462 (1948)

Leuthardt, F. — (1) Lehrbuch der Physiologischen Chemie. 14. Auflage, S. 173

Lohmann, K., L. Jendrassik — (33) Kolometrische Phosphorsäure-Bestimmung im Muskelextrakt. Biochem. Ztschr. 178, 419 (1926)

Löb, W., S. Gutmann — (21) Zur Kenntnis der Enzyme der Ovarien. Biochem. Zeitschrift 41, 445 (1912)

Merten, R. — (11) Störungen im Fermentstoffwechsel nach Mangelernährung. Klin. Woschr. 26, 260 (1948)

Mori, Sh. und Mitarbeiter — (30) On the relation between the sexual cycle of normal rats and fat oxydising granule contained in their sexual organs. Trans. Jap. Path. Soc. 19 (1929)

(Entnommen aus: Handbuch der Mikroskopischen Anat. des Menschen. v. Max Watzka, VII. Bd., 3. Teil)

Moss, S., D. R. Wrenn and J. F. Sykes (22) Some histological and histochemical observations of the bovin ovary during the estrous cycle. Anat. Rec. 120, 409 (1954)

Neumann, K., G. Oelert und H. Hausmann (25) Histochemische Lokalisation des Enzyms Phosphoamidase im weiblichen Genitaltrakt und Vaginalschleim. Zschr. Geburtsh. und Gyn. 141, 109 (1954)

Petry, G. (28) Die Proteinase in Liquor folliculi und ihre Bedeutung für den Follikelsprung. Fermentforschung 17, 2 (1943)

Purr, A. (17) Über die Aktivierung des Kathepsins und Papains durch Follikelhormone. B. Z. 320, 74 (1949)

Schäffner, A. und Trulle (13) Über intracelluläre Proteinase tierischen und pflanzlichen Ursprungs. B. Z. 315, 391 (1943)

Schochet (27) Warum platzt der Follikel? Surgery gynecol. a. obstetr. 31, 2 (1912)

Sörensen, S. P. L. (2) Ergebn. Physiol. 12, 393 (1912) Aus Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Leuthardt, 14. Aufl.

Stark, G., G. Siebert (10) Kathepsinaktivität in Placenta verschiedener Altersstufen. Arch. Gynäk. 185, 50 (1954)

Tauber, H. (7) The Chemistry and Technology of Enzymes. New York, J. Wiley and Sons (1949)

Willstätter, R., E. Bamann (3) Erste Abhandlung über die Enzyme der Leucocyten. Z. f. Physiol. Chem. 180, 127 (1928)

Wimsatt, W. S. (23) Glycogen, polysaccharide complexes and alkaline phosphatase in the ovary of the bat during hibernation and pregnancy. Anat. Rec. 103, 148 (1949)

L e b e n s l a u f

Am 18. August 1938 wurde ich in Ramallah / Palästina als Sohn des UNRWA-Beamten Tewfic Kidess und seiner Ehefrau Abla Kidess geborene Azzam geboren.

Ich besuchte das " Collége des Frères " in Haifa / Palästina bis zur mittleren Reife und bestand im Jahre 1954 am " National Protestant College " in Beirut / Libanon mein Abitur.

Im Sommersemester 1955 begann ich als Gasthörer an der Universität Tübingen mein Medizinstudium Am 17. April 56 legte ich an der Kepler-Gymnasium Tübingen eine Ergänzungsprüfung in Chemie, Physik und Biologie ab. Im Sommersemester 1958 bestand ich an der Universität Tübingen das Physikum. Ab Wintersemester 1958/59 belegte ich an der Universität Tübingen die klinischen Semester und absolvierte im Dezember 1961 das ärztliche Staatexamen.